

PATENT APPLICATION
published according to § 31 of Law No. 527/1990 Sb.

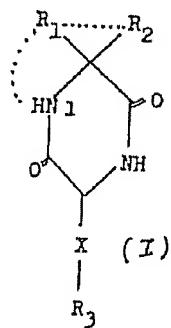
(19) CZECH REPUBLIC OFFICE OF INDUSTRIAL PROPERTY	(22) Filed: 07.21.2000 (40) Date of publication of application: 03.13.2002 (Gazette No. 3/2002)	(21) Document number 2000 – 2680 (13) Type of document: A3 (51) Int. Cl. ⁷ : C 07 K 5/12 //(A 61 K 38/12, A 61 P 25/16, A 61 P 25/28, A 61 P 29/00, A 61 P 11/00, A 61 P 27/12, A 61 P 9/10)
--	--	---

(71) Applicant
KASAFIREK, Evzen Ing. CSc., Prague, CZECH REPUBLIC;
FRIC Piemysl Prof. MUDr. Dr.Sc., Prague, CZECH REPUBLIC;
TOMASOVA Helena Prof. RNDr. CSc., Prague, CZECH REPUBLIC;

(72) Inventors:
Kasfirek, Evzen Ing., CSc. Prague, CZECH REPUBLIC;
Fric Piemysl Prof. MUDr. Sr Sc., Prague, CZECH REPUBLIC;
Tomasova Helena Prof. RNDr. SCs., Prague, CZECH REPUBLIC;

(54) Title of the invention:
Cyclic alkylthiopeptides

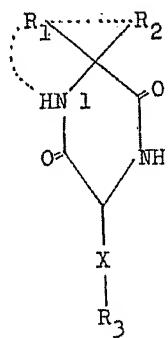
(57) Summary
Cyclic alkylthiopeptides of general formula I are antioxidant compounds, which protect the amino acid methionine from oxidation, which is contained in a number of biologically active peptides, for example, in α_1 -trypsin inhibitor or amyloid β -peptide. These compounds have the function of radical scavengers and can block and/or completely eliminate oxidation of a methionine and preserve the original activity of the biologically active peptide; they can be used in the production of pharmaceutical preparations in solid or liquid forms of administration for treatment of different inflammations and Alzheimer's disease.



Cyclic alkylthiopeptides

Field

The invention concerns cyclic alkylthiopeptides of the general formula



where

R₁ and R₂ denote the same or different C₁ to C₇ alkyls, straight-chain or branched, or joined by a chemical bond, in which one of these substituents or both can denote a hydrogen atom, R₂ denotes phenylmethyl, 4-hydroxyphenylmethyl, phenyl, 4-hydroxyphenyl, δ-guanidinopropyl, hydroxymethyl, carboxamidomethyl, 2-carboxamidoethyl, ε-aminobutyl or methylthioethylene, if R₂ is a hydrogen atom, R₁ can form a trimethylene or methylenethiomethylene chain with a nitrogen atom in position 1, X denotes a sulfur atom or methylene group, R₃ denotes a C₁ to C₄ alkyl group or a C₁ to C₂ methylenethioalkyl group.

These new compounds have the function of radical scavengers and protect methionine from oxidation in biologically active peptides. They can be used to treat different inflammations (pancreatitis, gingivitis) chronic pulmonary diseases, cerebral aneurysms, ocular disorders (cataract), Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cerebral insults, etc.

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

<p>(19) ČESKÁ REPUBLIKA</p>  <p>ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ</p>	<p>(22) Přihlášeno: 21.07.2000</p> <p>(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.03.2002 (Věstník č. 3/2002)</p>	<p>(21) Číslo dokumentu: 2000 - 2680</p> <p>(13) Druh dokumentu: A3</p> <p>(51) Int. Cl. ⁷: C 07 K 5/12 //(A 61 K 38/12, A 61 P 25/16, A 61 P 25/28, A 61 P 29/00, A 61 P 11/00, A 61 P 27/12, A 61 P 9/10)</p>
--	--	--

(71) Přihlašovatel:
 KASAFÍREK Evžen Ing. CSc., Praha, CZ;
 FRIČ Přemysl Prof. MUDr. DrSc., Praha, CZ;
 TOMÁŠOVÁ Helena Prof. RNDr. CSc., Praha, CZ;

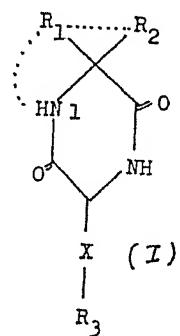
(72) Původce:
 Kasafirek Evžen Ing. CSc., Praha, CZ;
 Frič Přemysl Prof. MUDr. DrSc., Praha, CZ;
 Tomášová Helena Prof. RNDr. CSc., Praha, CZ;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Cyklické alkylthiopeptidy

(57) Anotace:

Cyklické alkylthiopeptidy obecného vzorce I jsou antioxidační sloučeniny, které chrání před oxidací aminokyselinu methioninu, který je obsažen v řadě biologicky aktivních peptidů, např. v α -trypsin inhibitoru nebo amyloidním β -peptidu. Tyto sloučeniny mají funkci lapačů radikálů a mohou oxidaci methioninu blokovat a/nebo zcela eliminovat a zachovat biologický aktivnímu peptidu jeho původní aktivitu; lze je použít k výrobě farmaceutických přípravků v pevných nebo tekutých dávkovacích formách k terapii různých zánětů a Alzheimerovy choroby.

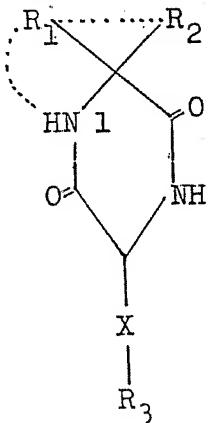


PV 2000 - 2680

Cyklické alkylthiopeptidy

Oblast techniky

Vynález se týká cyklických alkylthiopeptidů obecného vzorce



ve kterém

R₁ a R₂ značí stejné nebo různé alkyly C₁ až C₇, přímé nebo rozvětvené, popř. spojené chemickou vazbou, přičemž jeden z těchto substituentů, popř. oba mohou značit atom vodíku, R₂ značí fenylmetyl, 4-hydroxyfenylmetyl, fenyl, 4-hydroxyfenyl, δ -guanidinopropyl, hydroxymetyl, karboxamidometyl, 2-karboxamidoethyl, ϵ -aminobutyl anebo methylthioetylen, je-li R₂ atom vodíku, může R₁ tvořit trimetylenový, popř. metylenthiometylnový řetězec s atomem dusíku v poloze 1, X značí atom síry nebo metylenovou skupinu, R₃ značí alkylovou skupinu C₁ až C₄ nebo metylenthioalkylovou skupinu C₁ až C₂.

Tyto nové sloučeniny mají funkci radikálového scavengeru a chrání methionin před oxidací v biologicky aktivních peptidech. Lze je použít k léčbě při různých zánětech (pankreatitidy, gingivitidy), chronických plicních onemocněních, mozkových výdutích, očních poruchách (šedý zákal), Alzheimerově chorobě, Parkinsonově chorobě, mozkové příhodě a pod.

Dosavadní stav techniky

Některé aminokyseliny nebo peptidy, navržené jako antioxidační sloučeniny, chrání před oxidací a zárověň i před inaktivací methionin (Met³⁵⁸) v přirozeném endogenním inhibitoru proteináz; tento tzv. α_1 trypsin inhibitor (α_1 PI) je nejúčinějším přirozeným inhibitorem serinových proteináz, např. trypsinu, chymotrypsinu, leukocytární a pankreatické elastázy. Zmíněné proteolytické enzymy jsou výraznými iniciátory různých zánětlivých onemocnění, např. pankreatitidy, revmatoidní artritidy apod. Aminokyseliny nebo peptidy, dosud navrhované jako antioxidační sloučeniny k potenciální ochraně Met³⁵⁸ v α_1 PI, např. N-acetyl cysteine, methionin nebo glutathion (Agents & Action 22, 255-260 / 1987/), i když blokuje oxidaci methioninu v α_1 PI, mají takové chemické struktury, které jsou relativně málo stálé, mají krátký biologický poločas a vysoký clearens.

Podstata vynálezu

S překvapením bylo zjištěno, že cyklické alkylthiopeptidy uvedeného vzorce, v němž substituenty mají výše uvedený význam, jsou enzymaticky rezistentní sloučeniny, jejichž přítomné alkyl-sulfidické ligandy fungují jako scavengery a brání tak oxidaci methioninu na methioninsulfoxid v celé řadě biologicky aktivních peptidů, zvláště pak α_1 PI (BioFactors 3, 91-96 /1991/); oxidace methioninu v biologicky aktivních peptidech souvisí s celou řadou závažných onemocnění, jak již bylo zmíněno výše.

Význam methioninu, resp. jeho důležitost se uplatňuje i u amyloidního β -peptidu, který je součástí amyloidního plaku při Alzheimerově chorobě. Neurotoxicita $A\beta$ peptidu (1-40) anebo jeho fragmentu $A\beta$ (25-35) je spojená s oxidací methioninu (Met³⁵) v odpovídající methioninsulfoxid. Je zde proto předpoklad, že látky, které budou mít funkci radikálového scavengeru, mohou oxidaci Met³⁵ blokovat anebo zcela eliminovat. Sloučeniny s takovými vlastnostmi je pak možné využít v terapii Alzheimerovy choroby.

Vzhledem k rigidní chemické struktuře, jsou cyklické alkylthiopeptidy uvedeného obecného vzorce stabilní sloučeniny, což umožňuje jejich účelné použití v léčivech k terapii již zmíněných

onemocnění; s výhodou je lze aplikovat perorálně v pevných lékových formách, jako jsou enterosolventní tablety, tobolky nebo vodné suspenze s hodnotou pH 6 až 8, popř. i rektálně, rovněž ve formě vodné suspenze s hodnotou pH 6 až 8 nebo ve formě suspenze olejové.

Ochrana Met³⁵⁸ v α_1 -trypsin inhibitoru (α_1 -PI) sirnými sloučeninami obecného vzorce podle vynálezu před oxidací na methioninsulfoxid byla hodnocena postupem jak je uvedeno v Agents & Action 22, 255-260 (1987) s tím rozdílem, že ke sledování inhibice α_1 -PI byl použit trypsin a jeho zbytková aktivita byla stanovena chromogenním substrátem p-nitroanilidem N^α-tosyl-L-argininu (L-TAPA). Jako srovnávací sloučeniny byly použity N-acetyl-L-cystein (konc. 3 mg/1 ml) a oxidovaný glutathion (konc. 10 mg ve fyziologickém roztoku). Hodnoceny byly sloučeniny podle vynálezu: cyklo(Acp-Met) IIa, cyklo(Acp-Cys/Et/) IIc, cyklo(Acp-Cys/Bu/) IIe; všechny v koncentraci 2 mg/l ml DMFA.

Uspořádání pokusu bylo provedeno tak, že roztok α_1 -PI (SERVA) o konc. 10 mg/50 ml TRIS pufru o pH 7,1 byl oxidován 3% peroxidem vodíku. V pokusech, při kterých bylo dosaženo 50 % inhibice trypsinu částečně inaktivovaným (oxidovaným) α_1 -PI, bylo za stejných oxidačních podmínek v přítomnosti sirných sloučenin podle vynálezu, zvýšena inhibiční schopnost α_1 -PI jak je uvedeno v Tabulce III

Tabulka III

Sirné sloučeniny	Zvýšení inhibice α_1 -PI
N-Acetyl-L-cystein	18 %
Glutathion oxidovaný	14 %
IIa cyklo(Acp-Met)	22 %
IIc cyklo(Acp-Cys/Et/)	20 %
IIe cyklo(Acp-Cys/Bu/)	14 %

Všechny meziprodukty a konečné látky byly připraveny syntézou v roztoku obvyklými metodami užívaných v chemii peptidů. Tyto sloučeniny je možné také připravit syntézou v pevné fázi, popř. syntézou pomocí enzymů.

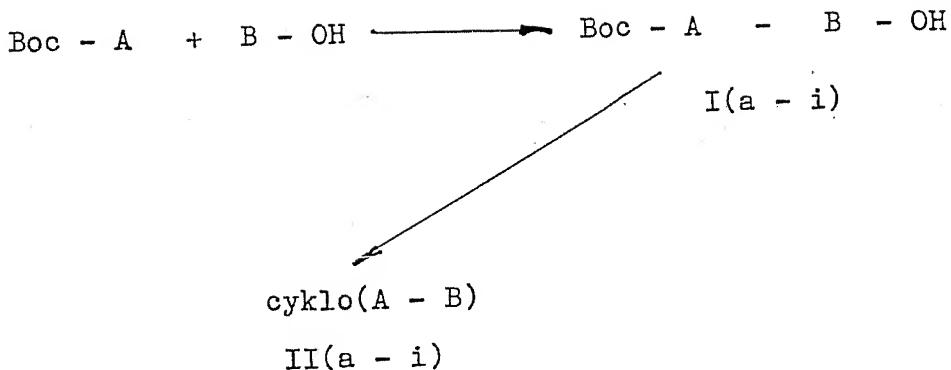
Syntetický postup přípravy sloučenin obecného vzorce podle vynálezu představuje Schéma 1. Analytická data (T.t.) mezi- produktů I(a-i) a konečných láttek II(a-h) jsou uvedena v Tabulce I. resp. v Tabulce II.

Vynález cyklických alkylthiopeptidů je blíže ilustrován, ale nijak omezen, v následujících příkladech provedení:

Použité zkratky a symboly mají následující význam:

Acp	= kyselina l-amino-l-cyklopentankarboxylová
Met	= methionin
Cys(Me)	= S-methylcystein
Cys(Et)	= S-etyl cystein
Cys(Pr)	= S-propylcystein
Cys(Bu)	= S-butyrcystein
Ala	= alanin
Phe	= fenylalanin
Boc	= tert.butyloxykarbonyl
CDI	= N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
OH-Suc	= N-hydroxysukcinimid
DMFA	= dimetylformamid

Schema 1



I, II	A	B
a	Acp	Met
b	Acp	Cys(Me)
c	Acp	Cys(Et)
d	Acp	Cys(Pr)
e	Acp	Cys(Bu)
f	Met	Ala
g	Phe	Met
h	Cys(Et)	Ala
i	Met	Acp

Příklady provedení

Příklad 1

Boc-Acp-Met-OMe (Ia)

K roztoku 4,6 g Boc-Acp (20 mmol) a 2,3 g OH-Suc v 50 ml DMFA ochlazeném na 0° C byl přidán 4,4 g CDI. Po 1 h míchání a chlazení při 5 °C byl přidán roztok Met-OMe ve 20 ml DMFA, uvolněného z odpovídajícího hydrochloridu (2,4 g; 20 mmol) N-etylpiriperidinem (2,8 ml; 20 mmol). Po 2 h míchání za teploty místnosti byla vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována, filtrát byl vakuově odpařen, odparek byl rozpuštěn v octanu etylnatém a postupně vytřepán 1% kyselinou citronovou (3x), vodou, 5% hydrogenuhličitanem sodným (3x), vodou, vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen. Pevný odparek byl krystalován ze směsi 30 ml octanu etylnatého a 200 ml petroleteru. Bylo získáno 6,35 g (85 % hmot.) (Ia) o t.t. 133-136 °C. Obdobným postupem byly připraveny sloučeniny I(b-i) uvedené v Tabulce I.

Cyklo(Acp-Met) (IIa)

K roztoku 3,75 g Boc-Acp-Met-OMe (10 mmol) ve 20 ml led. kyselině octové bylo přidáno 17 ml roztoku HCl/v kyselině octové (0,6 M). Po 2 h míchání reakčního roztoku za teploty místnosti, byl roztok vakuově odpařen, odparek byl rozpuštěn v 50 ml metanolu a znova odpařen; potom byl odparek rozpuštěn ve 30 ml metanolu a deionizován na sloupci slabě bazického anexu L 150. Metanolické eluáty byly odpařeny a pak ještě odpařeny (2x) se směsí metanol - toluen (10:1) a nakonec byl odparek rozpuštěn v 25 ml octanu etylnatého a po nechán 24 h za teploty místnosti. Vyloučený krystalický produkt byl odfiltrován a promyt eterem. Bylo získáno 1,65 g (68 % hmot.)(IIa) o t.t. 243-246 °C. Obdobným postupem byly připraveny sloučeniny II(b-h) uvedené v Tabulce II.

Tabulka I

I(a - i)	Teplota tání °C
Ia Boc-Acp-Met-OMe	133-136
Ib Boc-Acp-Cys(Me)-OMe	126-128
Ic Boc-Acp-Cys(Et)-OMe	132-134
Id Boc-Acp-Cys(Pr)-OMe	129-131
Ie Boc-Acp-Cys(Bu)-OMe	119-122
If Boc-Met-Ala-OMe	84-86
Ig Boc-Phe-Met-OMe	olej
Ih Boc-Cys(Et)-Ala-OMe	74-77
Ii Boc-Met-Acp-OMe	127-129

Tabulka II

II(a - h)	Teplota tání °C
IIa cyklo(Acp-Met)	243-246
IIb cyklo(Acp-Cys/Me/)	237-238
IIc cyklo(Acp-Cys/Et/)	220-221
IID cyklo(Acp-Cys/Pr/)	227-228
IIe cyklo(Acp-Cys/Bu/)	202-204
IIf cyklo(Met-Ala)	243-246
IIg cyklo(Phe-Met)	261-262
IIh cyklo(Cys/Et/-Ala)	233-235

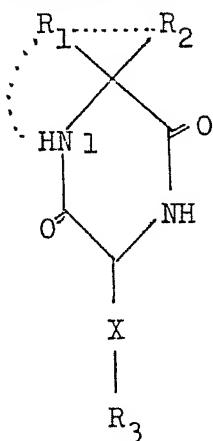
Průmyslová využitelnost

Tento vynález se týká použití cyklických alkylthiopeptidů uvedeného obecného vzorce k výrobě farmaceutických přípravků, určených k ochraně methioninu před jeho oxidací na odpovídající methioninsulfoxid. Methionin je vestavěn v biologicky aktivních peptidech, např. v $\frac{1}{4}$ trypsin inhibitoru (pozice Met³⁵⁸) nebo v amyloidním β -peptidu (pozice Met³⁵); oxidací na methioninsulfoxid dochází k ztrátě biologické aktivity. Sloučeniny podle vynálezu lze aplikovat perorálně nebo rektálně v pevných nebo tekutých dávkovacích formách, které lze vyrábět způsoby, běžnými ve farmaceutickém průmyslu.

PV 2000 - 2680

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Cyklické alkylthiopeptidy obecného vzorce



ve kterém

R₁ a R₂ značí stejné nebo různé alkyly C₁ až C₇, přímé nebo rozvětvené, popř. spojené chemickou vazbou, přičemž jeden z těchto substituentů, popř. oba mohou značit atom vodíku, R₂ značí fenylmetyl, 4-hydroxyfenylmetyl, fenyl, 4-hydroxyfenyl, δ -guanidinopropyl, hydroxymetyl, karboxamidometyl, 2-karboxamidoetyl, ϵ -aminobutyl anebo metylthioetylen, je-li R₂ atom vodíku, může R₁ tvorit trimetylenový, popř. metylenthiometylenový řetězec s atomem dusíku v poloze 1, X značí atom síry nebo metylenovou skupinu, R₃ značí alkylovou skupinu C₁ až C₄ nebo metylenthioalkylovou skupinu C₁ až C₂.